



Warszawa, 21.07.2022 r.

dr hab. Anna Sikora, prof. IBB PAN  
Pracownia Białej Biotechnologii  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anny Duber**

**pt. Biological caproic acid production in microbiome-based processes**

**wykonanej w Instytucie Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych na Wydziale Inżynierii  
Środowiska i Energetyki Politechniki Poznańskiej**

**pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Oleśkowicza-Popiela**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie zbiór trzech oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy Journal Citation Report (JCR). Są to następujące czasopisma: *Green Chemistry* (IF<sub>2021</sub>= 11.034), *Science of The Total Environment* (IF<sub>2021</sub>=10.753) i *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* (IF<sub>2021</sub>= 9.224).

We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką. Z oświadczeń współautorów wynika jednoznacznie, że jej udział w części doświadczalnej i, co ważne, w pisaniu manuskryptów był znaczący (60-75%).

Wiodącym tematem prac jest produkcja kwasu kapronowego z odpadu mleczarskiego, kwaśnej serwatki, przez wyselekcjonowane beztlenowe wspólnoty mikroorganizmów. Źródłem mikroorganizmów był beztlenowy osad z oczyszczalni ścieków, z którego poprzez długotrwałą selekcję w hodowlach ciągłych Doktorantka otrzymała konsorcja produkujące kwasy organiczne z dominującym udziałem kwasu kapronowego, pozbawione archeonów metanogennych. Badano warunki operacyjne pracy bioreaktorów najbardziej korzystne dla syntezy kwasu kapronowego, wpływ dodatków w postaci mleczanu i etanolu na przebieg procesu, bioróżnorodność wspólnot mikroorganizmów, korelacje pomiędzy poszczególnymi grupami mikroorganizmów a powstającymi

metabolitami, które wskazują dominujące szlaki metaboliczne w danych warunkach. Prace opublikowane w *Green Chemistry* i *Science of The Total Environment* przedstawiają układy ciągłe hodowli konsorcjów na podłożach zawierających kwaśną serwatkę z dodatkiem mleczanu i/lub etanolu a artykuł z czasopisma *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* opisuje hodowle stacjonarne na podłożach syntetycznych zawierających laktozę, mleczan i etanol w różnych kombinacjach.

Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się w ogólnoświatowe trendy i działania mające na celu wykorzystanie różnorodnych odpadów organicznych i produktów ubocznych przemysłu spożywczego w kierunku wartościowych bioproduktów. Produkcja kwasu kapronowego jest typowym przykładem białej biotechnologii, czyli wykorzystania naturalnych procesów prowadzonych przez mikroorganizmy (bioprocessów) do produkcji użytecznych dla człowieka substancji, typu leki, chemikalia, materiały polimerowe, biopaliwa, dodatki konsumpcyjne.

#### *Struktura rozprawy doktorskiej.*

Na początku rozprawy doktorskiej znajduje się informacja o projektach grantowych będących źródłem finansowania badań, następnie lista artykułów wchodzących w skład rozprawy i lista pozostałych publikacji Doktorantki z drugim autorstwem oraz informacja o wniosku patentowym, którego jest współautorką. Po spisie treści znajduje się trzystronicowe streszczenia w języku angielskim i polskim oraz listę stosowanych skrótów. Od str. 15 zaczyna się część opisująco-podsumowująca wyniki opublikowanych badań, składająca się ze wstępu, celu pracy, stosowanych metod, wyników połączonych z dyskusją, wniosków, uwag końcowych z perspektywami dalszych prac i przeglądem literatury kończącym się na str. 63 rozprawy. Opis ten uzupełniony jest o najnowszą wiedzę literaturową, o czym świadczy np. czterostronicowa Tabela 1, która jest rozbudowaną wersją Tabeli 1 z artykułu opublikowanego w czasopiśmie *Green Chemistry*. Następnie załączone są trzy artykuły naukowe wraz z suplementami oraz oświadczenia współautorów. Na końcu pracy (str. 137-141) znajduje się jeszcze raz lista wszystkich publikacji Doktorantki, jej udział w projektach grantowych, staże zagraniczne i krajowe, udział w konferencjach zagranicznych i krajowych. Wszystko to pokazuje wyróżniającą się aktywność naukową Doktorantki.

#### *Wartość merytoryczna rozprawy doktorskiej.*

Trzy oryginalne artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią logiczny ciąg opisujący kolejne etapy badań, ulepszany warsztat badawczy w celu pełniejszego zrozumienia szlaków metabolicznych syntezy kwasu kapronowego. We wszystkich pracach stosowano nowoczesne metody biologii molekularnej, metody analityczne, analizy bioinformatyczne, analizy statystyczne. O bardzo wysokiej wartości merytorycznej wykonanych badań świadczy poziom czasopism, w których zostały opublikowane artykuły. Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już ocenione pozytywnie przez recenzentów poszczególnych czasopism. Jako recenzentka pracy doktorskiej chciałam jedynie podjąć dyskusję z Doktorantką na temat otrzymanych wyników.

1. W rozdziale 1.3. jest mowa o zastosowaniach kwasu kapronowego. Jakie mechanizmy sprawiają, że kwas kapronowy ma właściwości antybakteryjne, poprawia wzrost roślin, do produkcji jakich farmaceutyków, substancji zapachowych czy barwników jest używany? Jakiej czystości wymagają te zastosowania? Czy możliwe jest jej osiągnięcie w zaprezentowanym układzie?
2. Czy Doktorantka może określić poziom gotowości technologicznej (TRL) systemu produkcji kwasu kapronowego opisanego w Publikacjach I i II. Jakie są możliwości na dzień dzisiejszy odczyszczenia kwasu kapronowego od pozostałych produktów fermentacji i jaka jest propozycja wykorzystania pozostałości? Czy jest rozważane opracowanie układów dwuetapowych, produkcji kwasu kapronowego i metanizacji pozostałości, zwłaszcza, gdy planowane jest skalowanie instalacji?
3. Uważa się, że warunki operacyjne zapewniają równowagę mikrobiomu bioreaktora, a ta stabilizację procesów metabolicznych i powstawanie pożądanego produktu końcowego. Czy wg Doktorantki prowadzenie procesu w ściśle określonych warunkach operacyjnych zdefiniowanych w Publikacjach I i II, typu stałe HRT, pH, stężenie substratu (kwaśnej serwatki), dodatek mleczanu i etanolu w optymalnych stężeniach zapewniłoby równowagę konsorcjum mikroorganizmów i prowadzenie procesu produkcji kwasu kapronowego w sposób ciągły stabilny? Czy mimo wszystko będą zachodziły jakieś zmiany?
4. Wiadomo, że większości mikroorganizmów nie można wyhodować w postaci czystych kultur. Czy podjęto jednak próby izolacji bakterii w postaci czystych kultur potencjalnych producentów kwasu kapronowego, ich identyfikacji i badania aktywności metabolicznej izolatów. Stwarza to możliwości odkrycia nowych szczepów bakterii syntetyzujących kwas kapronowy i w przyszłości wzbogacania nimi hodowli otwartych. Należałoby się ich spodziewać w rodzinach *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* i *Prevotellaceae*.
5. We wszystkich pracach kwas mlekowy/mleczan oznaczany był metodą HPLC, a pozostałe kwasy metodą chromatografii gazowej GC. Skąd taki wybór metod?
6. Czy w pracy opublikowanej w *Green Chemistry* badano skład gazu fermentacyjnego? Prawdopodobnie zawierał on metan w dniach poboru prób do oznaczeń składu konsorcjum, tj. dni poboru prób 36, 77, 292 i 336 (Figure 4)?
7. Czy planowana jest analiza metagenomiczna mikrobiomu bioreaktora produkcji kwasu kapronowego, oparta na sekwencjonowaniu całkowitego DNA nie tylko fragmentu genu kodującego 16SrRNA? Taka analiza dałaby możliwości określenia potencjału metabolicznego mikrobiomu bioreaktora w różnych warunkach operacyjnych, jego skład gatunkowy i dynamikę zachodzących zmian. Sekwencjonowanie fragmentu genu kodującego 16SrRNA nie daje takich możliwości.
8. W pracy opublikowanej w *Science of the Total Environment* dane na wykresie (Figura 1) pokazują, że w bioreaktorze produkowany był wodór i nastąpił wzrost stężenia maślanu wśród produktów fermentacji. Czy wg Doktorantki wodór mógł być produktem szlaku metabolicznego konwersji mleczanu i octanu do maślanu, czy istnieje jakieś inne wytłumaczenie?

Poniżej przedstawiam drobne uwagi krytyczne. Pierwsza z nich dotyczy terminologii w języku polskim – „fermentacja kultur otwartych”. Fermentacja laktozy czy glukozy oznacza, że substratem podlegającym fermentacji jest dany cukier. Fermentacja mlekowa czy etanolowa odnosi się do głównego produktu końcowego fermentacji, mleczanu lub etanolu. W „fermentacji kultur otwartych” kultury te nie są ani substratem ani produktem fermentacji, są narzędziem/sposobem prowadzenia procesu. Bardziej trafnymi byłyby określenia: fermentacje z użyciem kultur otwartych, hodowle otwarte kultur mieszanych, hodowle (otwarte) wspólnot/konsorcjów bakterii fermentacji mieszanych (w warunkach niesterylnych).

Druga uwaga dotyczy zasad pisowni jednostek taksonomicznych. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa pochodzą z j. łacińskiego i należy pisać je zawsze kursywą. Takie wymagania są stawiane w czasopismach z dziedziny mikrobiologii. W czasopismach z dziedziny chemii te zasady są nie do końca respektowane, przyjmuje się pisanie kursywą nazwy rodzaju i gatunku, a wyższe taksony czcionką prostą. W tekście rozprawy doktorskiej panuje w tym aspekcie bałagan i kompletna dowolność, raz nazwy pisane są kursywą, innym razem czcionką prostą.

Podsumowując, rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, zarówno w części merytorycznej, metodologicznej jak i w odniesieniu do dorobku, osiągnięć i aktywności naukowej mgr Anny Duber.

Praca w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami).

W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Wydziału Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Poznańskiej o dopuszczenie Doktorantki mgr Anny Duber do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady o nadanie wyróżnienia pracy doktorskiej.

Dr hab. Anna Sikora, prof. IBB PAN

